



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Maestría en Biociencias Aplicadas con mención en Biodescubrimiento

**miR-146 como potencial biomarcador de riesgo cardiometabólico en niños
que asisten a escuelas públicas en la región andina del Ecuador**

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Magíster
en Biociencias Aplicadas con
mención en Biodescubrimiento

Autor:

María José Molina Cando

CI:0103515201

Correo electrónico: mjmolina2410@gmail.com

Director:

Angélica María Ochoa Avilés

CI: 0104452693

Cuenca, Ecuador

07-diciembre-2021

RESUMEN

Antecedentes: La obesidad infantil es un factor de riesgo para el desarrollo enfermedades no transmisibles en edad adulta. Alteraciones en los patrones de expresión de microARNs circulantes se han correlacionado con el desarrollo de enfermedades como la obesidad, la hiperlipidemia y la diabetes.

Objetivo: Determinar y correlacionar los niveles de miR-146a en suero de escolares con sobrepeso u obesidad y escolares de peso normal de las ciudades de Quito y Cuenca con medidas antropométricas y valores séricos de leptina y adiponectina.

Métodos: Se realizó un estudio de casos y controles en niños con sobrepeso u obesidad (casos) y de peso normal (controles) de entre 6 a 8 años de las ciudades de Quito y Cuenca, Ecuador. Los datos antropométricos y los niveles séricos de leptina y adiponectina fueron obtenidos mediante técnicas estandarizadas. La cuantificación de miR-146a en suero se realizó por PCR en tiempo real mediante el equipo ABI QuantStudio5 de 4 canales (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). La asociación entre la expresión relativa de miR-146a y las variables sociodemográficas y factores de riesgo se determinaron mediante un modelo de regresión lineal.

Resultados: No se encontraron diferencias significativas en la expresión de miR-146a entre casos y control. Sin embargo, al comparar entre casos y controles se observó una tendencia de mayor expresión relativa de miR-146a en los casos. El miR-146a no se correlacionó significativamente con las medidas antropométricas y metabólicas de la población a excepción de la variable sexo. Las niñas presentaron una menor expresión relativa de miR-146a en comparación a los niños (β :-5.41; -10.50 - 0.33; $p=0.037$).

Conclusiones: El presente estudio sugiere que la expresión de miR-146a es dependiente del sexo del participante. Los niños presentan niveles circundantes mayores de miR-146a en suero en comparación que las niñas. No se encontraron asociaciones entre la expresión relativa de miR-146a entre casos y controles. Sin embargo, se observó una tendencia de mayor expresión relativa de miR-146a en niños con sobrepeso u obesidad, lo cual biológicamente podría estar asociado a un desequilibrio en la regulación de citocinas pro/antiinflamatorias. Futuros estudios deberían evaluar otros microARNs y adipocinas que podrían influenciar el desarrollo de obesidad y sus complicaciones en edad adulta.

Palabras clave: Sobrepeso. Obesidad. MicroARN. MiR-146a. Epigenética

ABSTRACT

Background: Childhood obesity is a risk factor for the development of non-communicable diseases in adulthood. Changes in the expression patterns of circulating microRNAs have been correlated with the development of diseases such as obesity, hyperlipidemia and diabetes.

Objective: To determine and correlate the serum level of miR-146a in overweight or obese schoolchildren and healthy children from the cities of Quito and Cuenca with anthropometric measurements and serum leptin and adiponectin values.

Methods: A case-control study was carried out in children with overweight or obesity (cases) and normal weight (controls) between 6 and 8 years old in the cities of Quito and Cuenca, Ecuador. Anthropometric data and serum levels of leptin and adiponectin were obtained using standardized techniques. The quantification of miR-146a in serum was performed by real-time PCR using the 4-channel ABI QuantStudio5 equipment (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). The association between the relative expression of miR-146a and the sociodemographic variables and risk factors were determined using a linear regression model.

Results: No significant differences were found in the expression of miR-146a between cases and controls. However, when comparing cases and controls, a trend of greater relative expression of miR-146a was observed in the cases. The miR-146a was not significantly correlated with the anthropometric and metabolic measures of the population with the exception of the sex variable. Girls presented a lower relative expression of miR-146a compared to boys (β : -5.41; -10.50 - 0.33; $p = 0.037$).

Conclusions: The present study suggests that the expression of miR-146a is dependent on the sex of the participant. Boys have higher serum levels of miR-146a compared to girls. No associations were found between the relative expression of miR-146a between cases and controls. However, a trend of greater relative expression of miR-146a in serum was observed in overweight or obese children, which biologically could be associated with an imbalance in the regulation of pro/anti-inflammatory cytokines. Future studies should evaluate other microRNAs and adipokines that could influence the development of obesity and its complications in adulthood.

Keywords: Overweight. Obesity. MicroRNA. MiR-146a. Epigenetics



Índice del Trabajo

Índice de contenidos

1. Introducción	7
2. Materiales y métodos	9
2.1 Diseño del estudio y población	9
2.2 Descripción de los sujetos de estudio	9
2.3 Recolección de datos y toma de muestra	10
2.4 Análisis de miR-146a	11
2.4.1 Extracción y cuantificación de ARN	11
2.4.2 Transcripción de ARN	11
2.4.3 Cuantificación de miR-146a	11
2.5 Análisis estadístico	11
3. Resultados	12
4. Discusión	15
5. Conclusiones	17
6. Agradecimientos	17
7. Referencias	17

Índice de tablas

Tabla 1. Características de la antropométricas y metabólicas de la población	13
Tabla 2. Asociación entre la expresión de miR-146a con las medidas antropométricas y valores séricos de leptina y adiponectina de los participantes.	15

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de flujo del estudio de casos y controles.	11
Figura 2. Niveles séricos de leptina (ng/ml) y la adiponectina (µg/ml) en niños con normopeso (n=32) y con sobrepeso/obesidad (n=34).	14
Figura 3. Expresión relativa de miR-146a en casos (n=32) y controles (n=32).	15

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo, María José Molina Cnado, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “miR-146 como potencial biomarcador de riesgo cardiometabólico en niños que asisten a escuelas públicas en la región andina del Ecuador”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 07 de diciembre de 2021



María Jose Molina Cando

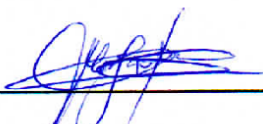
C.I: 0103515201



Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, María José Molina Cando, autor/a del trabajo de titulación “miR-146 como potencial biomarcador de riesgo cardiometabólico en niños que asisten a escuelas públicas en la región andina del Ecuador”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 07 de diciembre de 2021



María José Molina Cando

C.I: 0103515201

TÍTULO DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

miR-146 COMO POTENCIAL BIOMARCADOR DE RIESGO CARDIOMETABÓLICO EN NIÑOS QUE ASISTEN A ESCUELAS PÚBLICAS EN LA REGIÓN ANDINA DE ECUADOR

María José Molina-Cando¹, Efrén Santos-Ordoñez², Jorge Perez³, Lucy Baldeón Rojas³, Angélica Ochoa-Avilés¹

¹Departamento de Biociencias, Facultad de Ciencias Químicas

Universidad de Cuenca, maria.molinac24@ucuenca.edu.ec

² Docente Titular Facultad de Ciencias de la Vida

Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, gsantos@espol.edu.ec

³Instituto de Investigación en Biomedicina,

Universidad Central del Ecuador, lybaldeon@uce.edu.ec.

1. Introducción

La obesidad infantil es uno de los desafíos de salud pública más graves del siglo XXI (Blüher, 2019). En los países de ingresos bajos y medianos, la prevalencia del sobrepeso y la obesidad infantil entre los niños en edad preescolar es superior al 30% (WHO, 2018). En el año 2016, más de 41 millones de niños menores de 5 años y más de 340 millones de niños y adolescentes de 5 a 19 años tenían sobrepeso u obesidad (Abarca-Gómez et al., 2017). El sobrepeso y la obesidad son el resultado de una compleja interrelación de factores, como la dieta, la falta de actividad física, el estilo de vida sedentario y los factores genéticos o ambientales (Monzani et al., 2019). La causa fundamental del sobrepeso y la obesidad infantil es un desequilibrio energético entre las calorías consumidas y las calorías gastadas, con aumento del tejido adiposo, lo cual contribuye al desarrollo de enfermedades cardiometabólicas, diabetes mellitus 2, trastornos musculo-esqueléticos y ciertos tipos de cáncer, en edades más tempranas y en la vida adulta (Lee & Yoon, 2018; [WHO], 2013).

La obesidad al igual que la hipertensión arterial, las alteraciones de las concentraciones séricas de glucosa y lípidos, y la resistencia a la insulina se encuentran entre los factores de riesgo cardiometabólico (Ormazabal et al., 2018). La presencia de más de un factor de riesgo en niños o adolescentes incrementa considerablemente el riesgo de eventos cardiovasculares y cerebrovasculares en edad adulta (Twig et al., 2016). Los mecanismos relacionados con la etiología de la obesidad y las enfermedades cardiovasculares involucran diferentes vías fisiopatológicas. Especialmente, la obesidad genera un proceso inflamatorio que suele ser crónico y de bajo grado de intensidad caracterizado por el aumento de mediadores

inflamatorios como la interleuquina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Soltero et al., 2021; Stern et al., 2016). El TNF- α en las células del sistema inmune y del tejido adiposo, estimula la expresión de la leptina e inhibe la expresión de adiponectina; a ésta última adipocina se le atribuye propiedades antiinflamatorias, mayor sensibilidad a la insulina y menor porcentaje de anomalías metabólicas (Benbaibeché et al., 2020; Orlando et al., 2019).

En los últimos años se ha observado que estos procesos fisiopatológicos están regulados por moléculas claves como los microARNs (miARNs). Particularmente, se ha sugerido que alteraciones en la expresión de miARNs afecta la regulación de importantes vías metabólicas, como el metabolismo de los lípidos, la secreción de insulina estimulada por la glucosa y la inflamación (Fischer-Posovszky et al., 2016; Price et al., 2014). Los miARNs son pequeñas secuencias endógenas, monocatenarias conservadas de ARN no codificante, de 21 a 25 nucleótidos, involucrados en la regulación de diversos procesos biológicos como la diferenciación celular, proliferación y apoptosis en desarrollo embrionario y tisular (Sun et al., 2010). Los microARN representan solo el 2-3% del genoma, y se estima que pueden regular la expresión de aproximadamente el 60% de los genes. Estas moléculas de ARN no codificantes inhiben la expresión de genes, inhibiendo su traducción en proteínas o degradando los ARNm diana al unirse a su región no traducida (3'-UTR) (Pabón-Martínez, 2011; Vrijens et al., 2015). Cambios en los patrones de expresión de microARNs (miARNs) circulantes se han correlacionado con el desarrollo de enfermedades como la obesidad, la hiperlipidemia y la diabetes mellitus 2 (Cui et al., 2018; Flórez et al., 2020; Vriens et al., 2018). De manera particular, se ha sugerido que la expresión del microARN-146a (miR-146a) juega un rol importante en el desarrollo de enfermedades metabólicas y cardiovasculares en población adulta (Baldeón R et al., 2014; Siasos et al., 2020).

El miR-146a está codificado en el cromosoma humano 5q33.315 y su biogénesis se desarrolla en el núcleo celular. Aquí, la RNA polimerasa (RNAasa) II genera un transcrito denominado microRNA primario (pri-miR). A continuación el complejo microprocesador, compuesto por Drosha y sus proteínas asociadas (DGCR8/Pasha) procesan al pri-miR nuclear a un microRNA prematuro (pre-miRNA). El pre-miRNA es exportado hacia el citoplasma por la exportina-5 (Xpo-5), y por acción de la enzima RNAasa III Dicer, junto con su proteína asociada TRBP (transactivator RNA binding protein) da lugar a una molécula de doble cadena o miRNA dúplex, que contiene el miRNA maduro y su cadena complementaria. El miRNA dúplex es desnaturalizado por una helicasa que deja libre el miRNA maduro que se une al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) formando el complejo miRISC. La secuencia madura de miR-146a se une a la región no traducida (3'-UTR) del ARNm diana e induce la degradación de la transcripción o causa la represión de su traducción en proteínas (Paterson and Krieger 2017; O'Brien et al. 2018).

El microARN-146a (miR-146a) es uno de los microARN relacionados con la inflamación (Bhatt et al., 2016). El miR-146a maduro regula negativamente la señalización de factor nuclear-kappa B (NF- κ B) al reducir la expresión de proteínas necesarias para la activación de NF- κ B (p. ej., IRAK-1 y TRAF-6), el cual tiene la capacidad de incorporar vías de señalización para la regulación transcripcional de muchos genes relacionados con la inflamación, inmunidad, apoptosis y proliferación celular (Paik et al., 2011; West & McDermott, 2017). Limitada evidencia ha descrito la influencia del sobrepeso y la obesidad

en la expresión de miR-146 (Balasubramanyam et al., 2011; Hijmans et al., 2018). Los niveles bajos de miR-146a han sido asociados con un mayor riesgo de diabetes mellitus (Kong et al., 2011). En Ecuador, un estudio reveló una disminución de miR-146a sérico con aumento de citocinas proinflamatorias en pacientes adultos diabéticos como marcador discriminante de falla en el control de los niveles de glucosa (Baldeón R et al., 2014). En ratones diabéticos, inducidos por una dieta grasa, y con bloqueo de receptores de leptina se observó una desregulación de miR-146a (Xie et al., 2018). Otro estudio in vitro en modelos animales demostró que la transfección de miR-146a en adipocitos suprimió la reacción inflamatoria en dichos tejidos, y por lo tanto, miR-146a podría sugerirse como una molécula terapéutica potencial y como un regulador inflamatorio para la diabetes inducida por obesidad (Sanada et al., 2020). Por el contrario, un estudio en población infantil reportó una sobreexpresión de miR-146a en el suero de participantes con sobrepeso y obesidad (Cui et al. 2018).

En la actualidad existe un creciente interés en la identificación de miARNs como biomarcadores para el diagnóstico o de pronóstico de varias enfermedades (Condrat et al., 2020). Sin embargo, el estudio de patrones de expresión de miARNs en niños y adolescentes en países de ingresos bajos y medios es escaso. Comprender el mecanismo que contribuye al desarrollo de la obesidad infantil y sus complicaciones asociadas a los miARNs, es fundamental para la implementación de programas de prevención e intervención temprana. Es por eso que el objetivo del presente estudio fue: 1) determinar los niveles de miR-146a en suero de escolares con sobrepeso/obesos y de peso normal de las ciudades de Quito y Cuenca y 2) correlacionar la expresión de miR-146a con medidas antropométricas y valores séricos de leptina y adiponectina.

2. Materiales y métodos

2.1 Diseño del estudio y población

Los participantes del presente estudio se seleccionaron a partir de un estudio observacional, analítico, transversal previo titulado: “*Estudio del estado inmunológico de niños en edad escolar y su relación con el microbioma intestinal y con el agua potable que consumen*”, realizado en la región andina de Ecuador entre febrero y agosto de 2018; e incluyó la participación de 267 niños de 6 a 8 años que asistían a tres escuelas públicas del Ecuador. Dos escuelas ubicadas en el área rural de Pichincha (Uyumbicho y Guallabamba) y una escuela en el área urbana de la provincia de Azuay (Cañaribamba).

Este estudio y los consentimientos informados fueron aprobados por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito, Quito-Ecuador (código 2017-152-M). Todas las personas involucradas en el análisis de laboratorio firmaron un acuerdo de confidencialidad. Cualquier publicación no incluirá los nombres de los participantes.

2.2 Descripción de los sujetos de estudio

Para este estudio, se seleccionó una submuestra de 50 casos y 50 controles emparejados por sexo y edad (Figura 1). Los casos y controles fueron definidos en base al puntaje Z del índice de masa corporal (IMC) para la edad (de Onis et al., 2004). Los casos fueron niños que presentaron sobrepeso u obesidad (puntaje Z del IMC para la edad $\geq +1$) y los controles

fueron escolares con normopeso (puntaje Z del IMC para la edad ≥ -1 y $<+1$). Se excluyeron los niños con cáncer, obesidad secundaria por enfermedades endocrinas o enfermedades intercurrentes graves o que estuvieran expuestas a tratamiento hormonal.

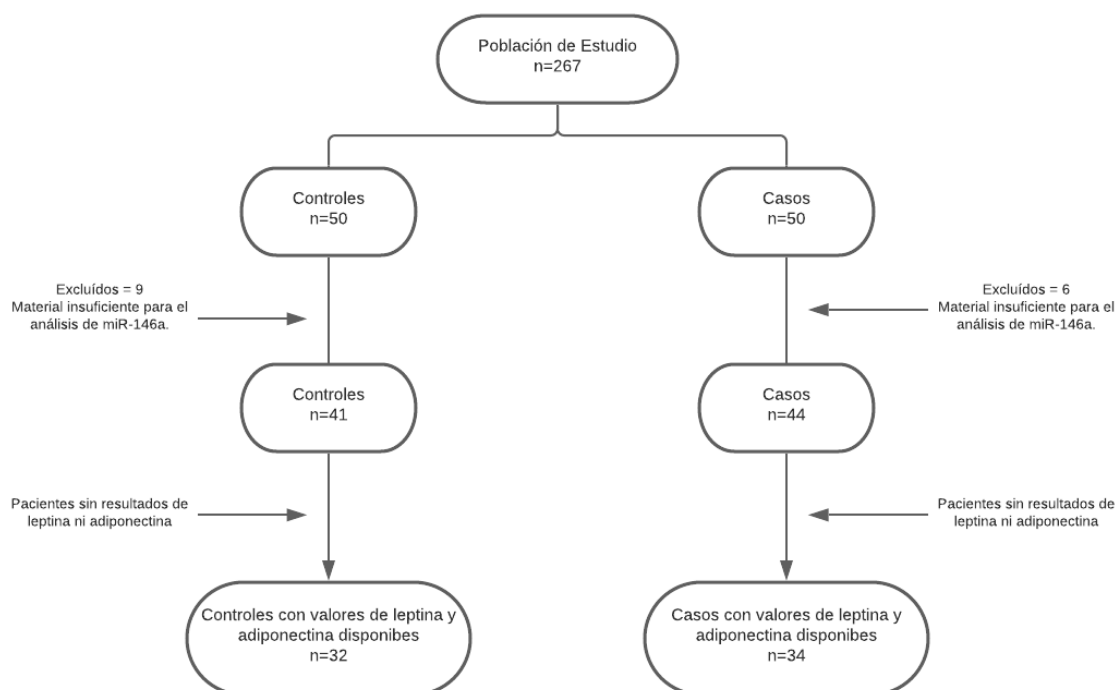


Figura 1. Diagrama de flujo del estudio de casos y controles. Se excluyó a quince participantes por material insuficiente para el análisis de miR-146a.

2.3 Recolección de datos y toma de muestra

El peso corporal y la talla se midieron por duplicado utilizando técnicas estandarizadas (Stewart et al., 2011). El peso se registró con una precisión de 0,10 kg utilizando una balanza digital (SECA 760. Hamburgo. Alemania) y la altura se registró al mm más cercano mediante dispositivos de medición portátiles (SECA 213 Alemania). El índice de masa corporal (IMC) se calculó como kg/m^2 del niño. Se definió desnutrición, peso normal, sobrepeso y obesidad en base a las puntuaciones Z del IMC específicas para la edad y el sexo de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Organización Mundial de la Salud, 2007).

Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción por la mañana después de un ayuno nocturno (8 a 12 horas) en tubos libres de anticoagulante, previamente codificados. Una vez finalizada la extracción de sangre, las muestras fueron centrifugadas a 3400 rpm durante 8 minutos. La fracción de suero fue separada y almacenada en refrigeración hasta su procesamiento. La leptina (ng/ml) y la adiponectina ($\mu\text{g/ml}$) fueron cuantificadas mediante la técnica de sándwich ELISA utilizando kits DIASource (DIASource ImmunoAssays SA, Bélgica); las lecturas de leptina y adiponectina se realizaron mediante un equipo lector HS Human ELISA (Human, Wiesbaden-Alemania). Se obtuvieron 32 controles y 34 casos con valores disponibles de leptina y adiponectina. La fracción restante de suero fue almacenada a -80°C para análisis posteriores.

2.4 Análisis de miR-146a

2.4.1 Extracción y cuantificación de ARN

A partir de las muestras de suero, almacenadas a -80°C en el Instituto de Investigación de Biomedicina (INBIOMED) de la Universidad Central del Ecuador, se extrajo y purificó ARN utilizando el Kit de extracción Quick-RNA™ Viral Kit de Zymo Research de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El ARN total extraído se cuantificó por espectrofotometría UV-VIS en el equipo NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y se diluyó a una concentración de $2\text{ ng}/\mu\text{l}$. Para corregir las variaciones derivadas de la extracción, se añadió a cada muestra un microARN sintético no-humano (miARN-cel-39 de *C. elegans*) como control endógeno.

2.4.2 Transcripción de ARN

Para obtener ADNc se realizó una reacción de transcripción inversa dúplex de acuerdo a los protocolos estandarizados del INBIOMED (Baldeón R et al., 2014). El ADNc se sintetizó a partir de $5\text{ }\mu\text{l}$ ($2\mu\text{g}/\mu\text{l}$) del ARN total utilizando el kit de transcripción reversa MicroRNA TaqMan® de Applied Biosystems con los cebadores RT específicos para miR-146a (hsa-miR-146a) y sync-cel-miR-39. Las condiciones de la reacción de retrotranscripción en el termociclador (GeneAmp PCR System 2700) fueron: 30 min a 16°C , 30 min a 42°C , 5 min a 85°C y se mantuvo a 4°C hasta su cuantificación (máximo 24 horas).

2.4.3 Cuantificación de miR-146a

El ADNc para el miR-146a y para el control endógeno se cuantificó en un volumen de reacción de $20\text{ }\mu\text{l}$ mediante una PCR en tiempo real (qPCR) en el equipo ABI QuantStudio5 de 4 canales (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Las condiciones de qPCR fueron 2 min a 50°C , 10 min a 95°C , seguido por 40 ciclos de 15s a 95°C , y finalmente 1 min a 60°C . Se utilizó el software QuantStudio™ Design & Analysis para el proceso de estandarización de los valores de C_t y la normalización de los datos con el sync-cel-miR-39. La expresión del miRNA-146a se calculó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (User Bulletin, ABI). Para obtener la proporción de la expresión media muestral de los casos en relación con la expresión media muestral de los controles, calculamos el “Fold Change”. Para normalizar la expresión de miRNA-146-a calculamos el promedio de delta C_t (miR146-a menos sync-cel-39) del grupo control y calibramos a este grupo a una real expresión de 100% y configuramos su “Fold Change” a 1. A partir del grupo Controles normalizado, se sustrajo el promedio del delta CT del grupo Casos para obtener la relación de su expresión al compararlo con el grupo Control.

2.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando Stata V.12.0 (Stata Statistical Software: Release 12. College Station, TX: StataCorp LLC). Las características de la población se representan como media (desviación estándar) y porcentajes (%). Las diferencias entre casos y controles con respecto a las características sociodemográficas (sexo y ciudad de procedencia) se analizaron mediante la prueba Chi Cuadrado. Las variables numéricas (edad, peso, talla, nivel sérico de leptina, nivel sérico de adiponectina, BMI, puntuación Z y expresión relativa de miR-146a) se evaluaron utilizando la Prueba T de dos muestras y el Test de MannWhitney según la distribución de los datos. La asociación entre la expresión relativa de miR-146a y las variables sociodemográficas y factores de riesgo se determinaron mediante un modelo de

regresión lineal. En primer lugar, se utilizó la correlación de Spearman (Rho). A continuación, las correlaciones con $p < 0,05$ se ingresaron en un modelo multivariable ajustado por el tipo de metodología. La fuerza de las asociaciones se estimó utilizando el coeficiente β , con intervalos de confianza del 95% (IC 95%). Todas las pruebas fueron realizadas con un nivel de significancia de 5%.

3. Resultados

Un total de 100 niños de 6 a 8 años, de las comunidades de Quito (55%) y Cuenca (45%) participaron en el estudio, de los cuales el 50% estuvo representado por el sexo masculino. Las características antropométricas y metabólicas de los participantes se describen en la Tabla 1. Al comparar con los controles, los casos (niños con sobrepeso u obesidad) presentaron valores significativamente más altos con respecto al peso (21.57 ± 2.02 vs 29.09 ± 4.35 , $p < 0.001$), talla (118.10 ± 4.76 vs 120.79 ± 4.25 , $p < 0.01$), IMC (15.43 ± 0.41 vs 19.84 ± 1.78 , $p < 0.001$) y las puntuaciones Z del IMC (-0.10 ± 0.26 vs 1.99 ± 0.58 , $p < 0.001$).

En relación a los indicadores metabólicos, solo las concentraciones séricas de leptina presentaron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles (Fig 2). Se observó mayor concentración sérica de leptina (0.85 ± 0.52 vs 3.89 ± 3.92 , $p < 0.001$) y menor concentración de adiponectina en los participantes del grupo de casos en comparación con los controles. No se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de miR-146a entre casos y controles. Sin embargo, se observó una tendencia de mayor expresión de miR-146a en los casos en comparación con los controles (Figura 3).

Tabla 1. Características de la antropométricas y metabólicas de la población

Variab	Controles (n=50)	Casos (n=50)	p
Edad (años)	7.47 \pm 0.66	7.44 \pm 0.64	0.9396
Sexo			
Femenino	50%	50%	1.00
Ciudad			
Quito	68%	42%	0.009
Cuenca	32%	58%	
Peso (kg/m ²)	21.57 \pm 2.02	29.09 \pm 4.35	< 0.001
Talla (cm)	118.10 \pm 4.76	120.79 \pm 4.25	0.004
IMC (kg/m ²)	15.43 \pm 0.41	19.84 \pm 1.78	< 0.001
Puntuación Z del IMC	-0.10 \pm 0.26	1.99 \pm 0.58	< 0.001
	Controles (n=41)	Casos (n=44)	p
Expresión 146 (2 ^{-$\Delta\Delta C_t$})	5.15 \pm 8.99	8.23 \pm 14.17	0.679
	Controles (n=32)	Casos (n=34)	p
Leptina (ng/ml)	0.85 \pm 0.52	3.89 \pm 3.92	< 0.001

Adiponectina ($\mu\text{g/ml}$)	7.79 ± 6.14	5.23 ± 5.84	0.083
-----------------------------------	-----------------	-----------------	-------

Nota: se muestra porcentajes, promedio y desviación estándar (DE) y los valores de p de las diferentes pruebas estadísticas.

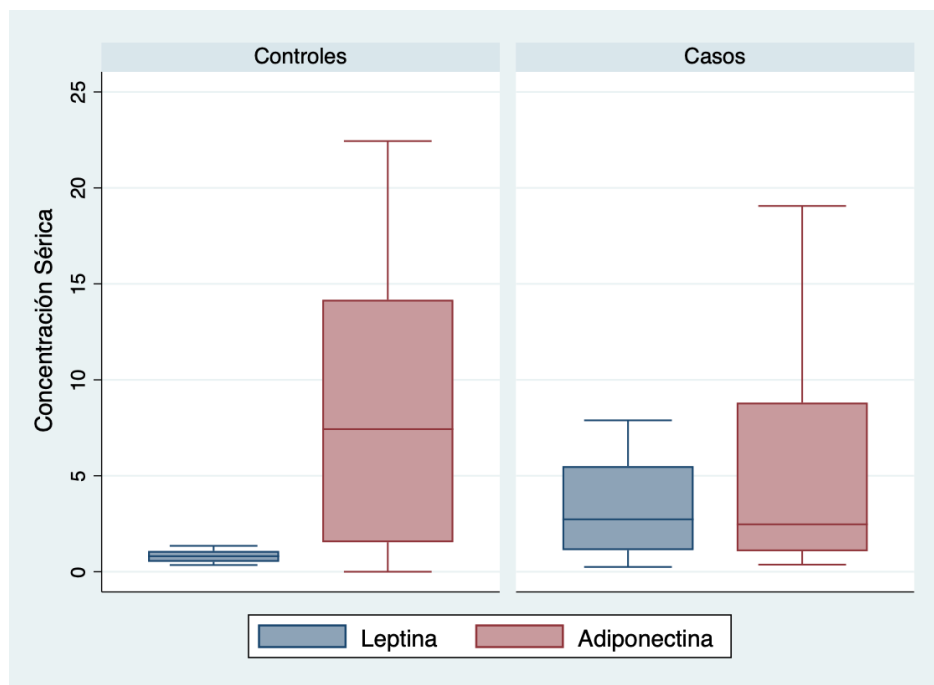


Figura 2. Niveles séricos de leptina (ng/ml) y la adiponectina ($\mu\text{g/ml}$) en niños con normopeso (n=32) y con sobrepeso/obesidad (n=34). Los resultados fueron comparados utilizando el test de Mann Whitney.

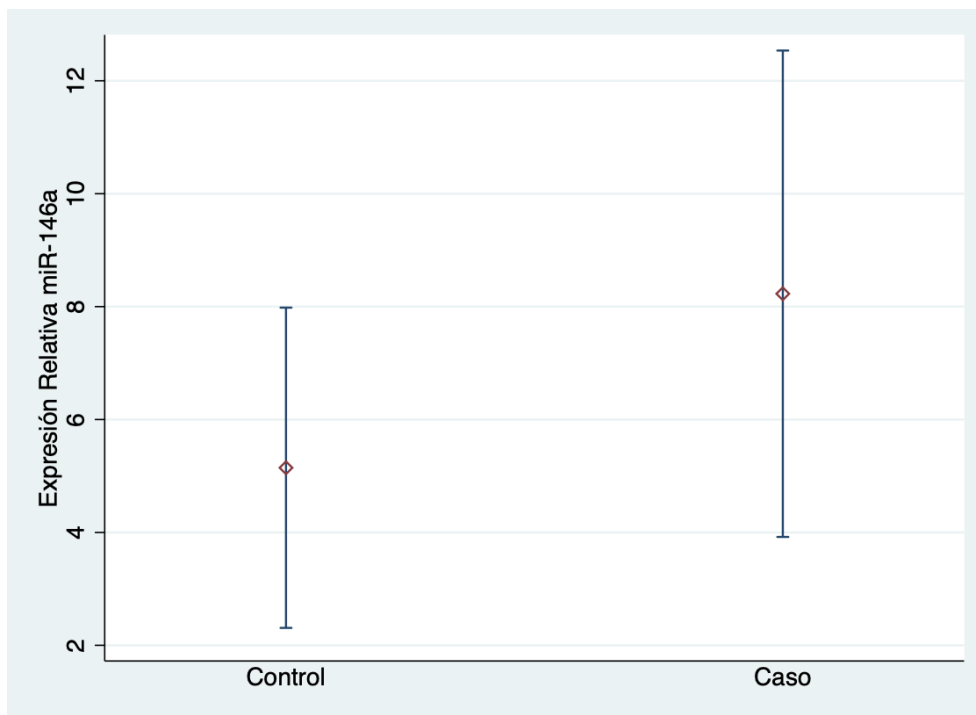


Figura 3. Expresión relativa de miR-146a en casos (n=34) y controles (n=32).

Se construyó un modelo de regresión para determinar las asociaciones entre la expresión de miR-146a con las medidas antropométricas y valores séricos de leptina y adiponectina de los participantes (Tabla 2). El miR-146a no se correlacionó significativamente con las medidas antropométricas y metabólicas de la población a excepción de la variable sexo. Los niñas presentaron una menor expresión relativa de miR-146a en comparación a los niños (β :-5.41; -10.50 - 0.33; $p=0.037$).

Tabla 2. Asociación entre la expresión de miR-146a con las medidas antropométricas y valores séricos de leptina y adiponectina de los participantes.

Variables	miR-146a		Modelo ajustado	
	(r^2 value)	p	Coefficiente β (IC 95%)	p
Edad	0.04	0.712		
Sexo	-0.24	0.028	-5.42 (-10.50 - 0.33)	0.037
(Masculino/ Femenino)				
Ciudad	-0.01	0.918		
(Quito/Cuenca)				
Puntuación Z	0.12	0.273		
Leptina	0.01	0.941		
Adiponectina	-0.01	0.941		

r: coeficiente de pearson.

4. Discusión

La obesidad infantil se ha convertido en un grave problema de salud pública mundial. La identificación de biomarcadores séricos para el diagnóstico temprano y/o el tratamiento de la obesidad y su complicación en etapas tempranas como los miARNs es esencial para la prevención de enfermedades no transmisibles en edad adulta (Jiménez-Avalos et al., 2021; Sanada et al., 2020). Este es el primer estudio en Latino América que evalúa la expresión relativa del miR-146a y su relación con factores de riesgo cardiometabólico en niños de 6 a 8 años de la sierra Ecuatoriana.

Se conoce que los miARNs juegan un importante rol en la regulación de muchos procesos biológicos asociados con la obesidad y sus complicaciones (Karolina et al., 2012). Varios miARNs específicos como miR-15b, miR-486, miR-122 y miR-146a se expresan de manera diferencial en pacientes con obesidad en comparación con individuos sanos y son candidatos potenciales a biomarcadores (Flórez et al., 2020; Ji & Guo, 2019). En este estudio se determinó únicamente la expresión de miR-146a. En general no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de miR-146a; sin embargo al comparar casos y controles se observó una tendencia de mayor expresión relativa del miR-146a en niños con sobrepeso u obesidad. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos donde se ha reportado una sobreexpresión relativa de este microARN en el suero de niños y adultos con obesidad (Ortiz-Dosal et al., 2019; Russo et al., 2018). Incluso la expresión relativa de este microARN se ha asociado positivamente con parámetros antropométricos como el IMC y la grasa abdominal (Cui et al., 2018). Además, el miR-146a está regulado positivamente en los adipocitos en condiciones inflamatorias, lo cual explicaría su sobreexpresión al ser los adipocitos los principales contribuyentes de los niveles de este microARN en suero de pacientes con sobrepeso u obesidad (Cui et al., 2018; Roos et al., 2016; Thomou et al., 2017). Por el contrario estudios en adultos con obesidad, diabetes y/o hipertensión se ha documentado una desregulación de miR-146a (Hijmans et al., 2018; Pordzik et al., 2019). Un metanálisis con un total de 12 estudios que incluían 344 pacientes diabéticos y 316 controles, encontró que la desregulación de miR-146a podría estar asociada con la susceptibilidad a la diabetes tipo 2. Aunque no existe un consenso sobre la sobreexpresión o desregulación de este microARN en la patogénesis de esta enfermedad, se cree que el estado fisiológico y patológico de los participantes puede influir en la expresión del miR-146a. Incluso, se estima que el sobrepeso como la obesidad están asociados con la incidencia múltiple de 18 comorbilidades, incluida la diabetes tipo 2, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares en edad adulta (Guh et al., 2009). Las alteraciones en la sobreexpresión de miARNs circundantes pueden reflejar una respuesta dinámica al estrés metabólico en un intento por restablecer la homeostasis o una respuesta continua involucrada en el desarrollo de la enfermedad (Vriens et al., 2018). Además es posible que la secreción elevada de miR-146a de los adipocitos pueda influir en los procesos en las células circundantes (Ji & Guo, 2019; Roos et al., 2016). Más estudios en población pediátrica son necesarios para comprender su rol en la patogénesis de la obesidad y, como la presencia de otras comorbilidades puede afectar su expresión de miR-146a en edad adulta.

Un hallazgo importante que se reporta en este estudio es que la expresión de miR-146a difiere significativamente entre hombres y mujeres. Los niños tienden a expresar mayores concentraciones de miR-146a circulantes en comparación con las niñas. Aunque no existe

evidencia que sugiera que la concentración relativa de este microARN esté relacionado con factores individuales como el sexo, se conoce que las diferencias tanto hormonales y genéticas entre hombres y mujeres, así como, el estilo de vida influyen en la regulación de microARNs y por ende, su expresión influenciará en la prevalencia, gravedad y resultado de las enfermedades (Palmer et al., 2014; Sharma & Eghbali, 2014; Vriens et al., 2018). Se ha reportado que la grasa visceral, con mayor predominio en hombres, es metabólicamente más activa que la grasa subcutánea presente en mayor prevalencia en mujeres (Lumish et al., 2020). Además, se sabe que un estilo de vida poco saludable es la causa predominante de la obesidad. Especialmente, se ha reportado un consumo alto de alimentos grasos y azucarados en niños, en comparación con las niñas que prefieren frutas y verduras (Cooke & Wardle, 2005; Krølner et al., 2011). Incluso se conoce que a más de la dieta y la inactividad física, los niveles altos de sedentarismo potencialmente alteran la progresión de ciertas enfermedades e interviene en la expresión de miARNs (Palmer et al., 2014; Russo et al., 2018; Vriens et al., 2018). Las diferencias en la expresión de miR-146a entre hombres y mujeres pueden ayudarnos a comprender mejor las diferencias biológicas y fisiológicas, así como desarrollar vías terapéuticas para el tratamiento o prevención de obesidad, diabetes y síndrome metabólico basadas en el sexo (Mauvais-Jarvis, 2015). Más estudios con tamaños de muestra más grandes son necesarios para corroborar si la expresión de miR-146a es dependiente del sexo del participante y como factores como el estilo de vida influyen en su expresión.

Los perfiles de adipocinas (leptina y adiponectina), en los participantes fueron consistentes con lo reportado en la literatura (Mi et al., 2010). Los niños con sobrepeso y obesidad presentaron una alta concentración sérica de leptina, en comparación con los controles sanos. A pesar de que las diferencias séricas de adiponectina no fueron estadísticamente significativas, se observó una menor concentración de adiponectina en los casos en comparación con los controles. Estos resultados sugieren que en tempranas edades ya se observa un proceso inflamatorio importante en niños con sobrepeso u obesidad con niveles desequilibrados de citocinas pro/antiinflamatorias (Ellulu et al., 2017). La razón de estos valores se debe a que el tejido adiposo se comporta como un sistema endocrino que secreta leptina en proporción a los depósitos de grasa corporal (Frühbeck et al., 2019). Por el contrario los niveles de adiponectina son influenciados por hipertrofia de los adipocitos y la infiltración de macrófagos que desencadena un desequilibrio en la síntesis de adiponectinas (Blancas-Flores et al., 2010). Este desequilibrio, y de manera sostenida se considera un factor de riesgo importante para desarrollar muchas enfermedades, incluidas las enfermedades cardiovasculares, el síndrome metabólico, la diabetes y el cáncer (Ellulu et al., 2017). Por lo tanto, la prevención, así como el tratamiento del sobrepeso y la obesidad en niños, es clave fundamental para evitar la obesidad y sus complicaciones en edad adulta.

Este estudio tiene algunas limitaciones. Primero, al tratarse de un estudio piloto, hay limitaciones en cuanto al poder estadístico para detectar asociaciones dentro de las diferentes variables debido al tamaño de la muestra. Segundo, únicamente se midió la asociación entre los niveles de miR-146a y factores de riesgo cardiometabólico, y no se exploró otros miARNs y factores como el estilo de vida relacionados con el sobrepeso y obesidad infantil. Otra limitación es que, al ser un estudio transversal, no se puede inferir causalidad. Teniendo en cuenta nuestros resultados, futuros estudios que se realicen en una muestra representativa

deberían evaluar otros miARNs relacionados con la inflamación y citoquinas que podrían influenciar el desarrollo de obesidad y sus complicaciones.

5. Conclusiones

El presente estudio sugiere que la expresión de miR-146a es dependiente del sexo del participante. Los niños presentan niveles circundantes mayores de miR-146a en suero en comparación que las niñas. No se encontraron asociaciones entre la expresión relativa de miR-146a entre niños con sobrepeso u obesidad en comparación con niños sanos. Sin embargo, al comparar casos y controles se observó una tendencia de mayor expresión relativa de miR-146a en los casos, lo cual biológicamente podría estar asociado a un desequilibrio en la regulación de citocinas pro/antiinflamatorias, y el desarrollo de la obesidad y su complicaciones. La expresión de miR-146a podría representar un nuevo biomarcador clínico en niños con sobrepeso u obesidad. Futuros estudios que evalúen la interacción con otros microARNs inflamatorios así como el estilo de vida actual de los niños son necesarios para comprender el progreso de la obesidad a la inflamación y los diferentes mecanismos que regulan este proceso en las primeras etapas de la vida.

6. Agradecimientos

Este trabajo fue realizado dentro del marco de un financiamiento brindado por el Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca y la Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL. Agradezco especialmente a la Dra. Angélica Ochoa y la Dra. Johana Ortiz por la gestión realizada para el financiamiento y desarrollo del presente proyecto de investigación.

7. Referencias

- Abarca-Gómez, L., Abdeen, Z. A., Hamid, Z. A., Abu-Rmeileh, N. M., Acosta-Cazares, B., Acuin, C., Adams, R. J., Aekplakorn, W., Afsana, K., Aguilar-Salinas, C. A., Agyemang, C., Ahmadvand, A., Ahrens, W., Ajlouni, K., Akhtaeva, N., Al-Hazzaa, H. M., Al-Othman, A. R., Al-Raddadi, R., Al Buhairan, F., ... Ezzati, M. (2017). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *The Lancet*, 390(10113), 2627–2642. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32129-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32129-3)
- Balasubramanyam, M., Aravind, S., Gokulakrishnan, K., Prabu, P., Sathishkumar, C.,

- Ranjani, H., & Mohan, V. (2011). Impaired miR-146a expression links subclinical inflammation and insulin resistance in Type 2 diabetes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 351(1-2), 197–205. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0727-3>
- Baldeón R, L., Weigelt, K., de Wit, H., Ozcan, B., van Oudenaren, A., Sempértégui, F., Sijbrands, E., Grosse, L., Freire, W., Drexhage, H. A., & Leenen, P. J. M. (2014). Decreased serum level of miR-146a as sign of chronic inflammation in type 2 diabetic patients. *PloS One*, 9(12), e115209. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115209>
- Benbaibeche, H., Hichami, A., Oudjit, B., Haffaf, E. M., Kacimi, G., Koceir, E. A., & Khan, N. A. (2020). Circulating mir-21 and mir-146a are associated with increased cytokines and CD36 in Algerian obese male participants. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 1–6. <https://doi.org/10.1080/13813455.2020.1775655>
- Bhatt, K., Lanting, L. L., Jia, Y., Yadav, S., Reddy, M. A., Magilnick, N., Boldin, M., & Natarajan, R. (2016). Anti-Inflammatory Role of MicroRNA-146a in the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 27(8), 2277–2288. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015010111>
- Blancas-Flores, G., César Almanza-Pérez, J., Ivette López-Roa, R., Javier Alarcón-Aguilar, F., García-Macedo, R., & Cruz, M. (2010). Obesity as an inflammatory process. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 67(2), 88. <https://www.medigraphic.com/pdfs/bmhim/hi-2010/hii102b.pdf>
- Blüher, M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews. Endocrinology*, 15(5), 288–298. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>
- Condrat, C. E., Thompson, D. C., Barbu, M. G., Bugnar, O. L., Boboc, A., Cretoiu, D., Suciu, N., Cretoiu, S. M., & Voinea, S. C. (2020). miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells*, 9(2).

<https://doi.org/10.3390/cells9020276>

Cooke, L. J., & Wardle, J. (2005). Age and gender differences in children's food preferences. *The British Journal of Nutrition*, 93(5), 741–746.

<https://doi.org/10.1079/bjn20051389>

Cui, X., You, L., Zhu, L., Wang, X., Zhou, Y., Li, Y., Wen, J., Xia, Y., Wang, X., Ji, C., & Guo, X. (2018). Change in circulating microRNA profile of obese children indicates future risk of adult diabetes. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 78, 95–105.

<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.09.006>

de Onis, M., Wijnhoven, T. M. A., & Onyango, A. W. (2004). Worldwide practices in child growth monitoring. *The Journal of Pediatrics*, 144(4), 461–465.

<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2003.12.034>

Ellulu, M. S., Patimah, I., Khaza'ai, H., Rahmat, A., & Abed, Y. (2017). Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Archives of Medical Science: AMS*, 13(4), 851–863. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58928>

Fischer-Posovszky, P., Roos, J., Kotnik, P., Battelino, T., Inzaghi, E., Nobili, V., Cianfarani, S., & Wabitsch, M. (2016). Functional Significance and Predictive Value of MicroRNAs in Pediatric Obesity: Tiny Molecules with Huge Impact? *Hormone Research in Paediatrics*, 86(1), 3–10. <https://doi.org/10.1159/000444677>

Flórez, C. A. R., García-Perdomo, H. A., & Escudero, M. M. (2020). MicroRNAs Associated with Overweight and Obesity in Childhood: A Systematic Review. *MicroRNA (Sharjah, United Arab Emirates)*, 9(4), 255–265.

<https://doi.org/10.2174/2211536609666191209152721>

Frühbeck, G., Catalán, V., Rodríguez, A., Ramírez, B., Becerril, S., Salvador, J., Colina, I., & Gómez-Ambrosi, J. (2019). Adiponectin-leptin Ratio is a Functional Biomarker of

- Adipose Tissue Inflammation. *Nutrients*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/nu11020454>
- Guh, D. P., Zhang, W., Bansback, N., Amarsi, Z., Birmingham, C. L., & Anis, A. H. (2009). The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*, 9, 88. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-9-88>
- Hijmans, J. G., Diehl, K. J., Bammert, T. D., Kavlich, P. J., Lincenberg, G. M., Greiner, J. J., Stauffer, B. L., & DeSouza, C. A. (2018). Influence of Overweight and Obesity on Circulating Inflammation-Related microRNA. *MicroRNA (Sharīqah, United Arab Emirates)*, 7(2), 148–154. <https://doi.org/10.2174/2211536607666180402120806>
- Ji, C., & Guo, X. (2019). The clinical potential of circulating microRNAs in obesity. *Nature Reviews. Endocrinology*, 15(12), 731–743. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0260-0>
- Jiménez-Avalos, J. A., Fernández-Macías, J. C., & González-Palomo, A. K. (2021). Circulating exosomal MicroRNAs: New non-invasive biomarkers of non-communicable disease. *Molecular Biology Reports*, 48(1), 961–967. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06050-w>
- Karolina, D. S., Tavintharan, S., Armugam, A., Sepramaniam, S., Pek, S. L. T., Wong, M. T. K., Lim, S. C., Sum, C. F., & Jeyaseelan, K. (2012). Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(12), E2271–E2276. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1996>
- Kong, L., Zhu, J., Han, W., Jiang, X., Xu, M., Zhao, Y., Dong, Q., Pang, Z., Guan, Q., Gao, L., Zhao, J., & Zhao, L. (2011). Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study. *Acta Diabetologica*, 48(1), 61–69. <https://doi.org/10.1007/s00592-010-0226-0>

- Krølner, R., Rasmussen, M., Brug, J., Klepp, K.-I., Wind, M., & Due, P. (2011). Determinants of fruit and vegetable consumption among children and adolescents: a review of the literature. Part II: qualitative studies. In *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity* (Vol. 8, Issue 1, p. 112).
<https://doi.org/10.1186/1479-5868-8-112>
- Lee, E. Y., & Yoon, K.-H. (2018). Epidemic obesity in children and adolescents: risk factors and prevention. *Frontiers of Medicine*, 12(6), 658–666.
<https://doi.org/10.1007/s11684-018-0640-1>
- Lumish, H. S., O'Reilly, M., & Reilly, M. P. (2020). Sex Differences in Genomic Drivers of Adipose Distribution and Related Cardiometabolic Disorders. In *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (Vol. 40, Issue 1, pp. 45–60).
<https://doi.org/10.1161/atvbaha.119.313154>
- Mauvais-Jarvis, F. (2015). Sex differences in metabolic homeostasis, diabetes, and obesity. *Biology of Sex Differences*, 6, 14. <https://doi.org/10.1186/s13293-015-0033-y>
- Mi, J., Munkonda, M. N., Li, M., Zhang, M.-X., Zhao, X.-Y., Fouejeu, P. C. W., & Cianflone, K. (2010). Adiponectin and leptin metabolic biomarkers in chinese children and adolescents. *Journal of Obesity*, 2010, 892081.
<https://doi.org/10.1155/2010/892081>
- Monzani, A., Ricotti, R., Caputo, M., Solito, A., Archero, F., Bellone, S., & Prodam, F. (2019). A Systematic Review of the Association of Skipping Breakfast with Weight and Cardiometabolic Risk Factors in Children and Adolescents. What Should We Better Investigate in the Future? *Nutrients*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/nu11020387>
- Orlando, A., Nava, E., Giussani, M., & Genovesi, S. (2019). Adiponectin and Cardiovascular Risk. From Pathophysiology to Clinic: Focus on Children and

Adolescents. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13).

<https://doi.org/10.3390/ijms20133228>

Ormazabal, V., Nair, S., Elfeky, O., Aguayo, C., Salomon, C., & Zuñiga, F. A. (2018).

Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease.

Cardiovascular Diabetology, 17(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0762-4>

Ortiz-Dosal, A., Rodil-García, P., & Salazar-Olivo, L. A. (2019). Circulating microRNAs

in human obesity: a systematic review. *Biomarkers: Biochemical Indicators of*

Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals, 24(6), 499–509.

<https://doi.org/10.1080/1354750X.2019.1606279>

Pabón-Martínez, Y. V. (2011). MicroRNA (miRNA): A molecular view. *Revista de La*

Universidad Industrial de Santander. Salud, 43(3), 289–297.

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-08072011000300010&script=sci_arttext&tlng=pt)

[08072011000300010&script=sci_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-08072011000300010&script=sci_arttext&tlng=pt)

Paik, J. H., Jang, J.-Y., Jeon, Y. K., Kim, W. Y., Kim, T. M., Heo, D. S., & Kim, C.-W.

(2011). MicroRNA-146a downregulates NFκB activity via targeting TRAF6 and functions as a tumor suppressor having strong prognostic implications in NK/T cell lymphoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American*

Association for Cancer Research, 17(14), 4761–4771. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0494>

Palmer, J. D., Soule, B. P., Simone, B. A., Zaorsky, N. G., Jin, L., & Simone, N. L. (2014).

Dietary alterations caused by microRNA: Can food be medicinal. *Ageing Research Reviews*.

Pordzik, J., Jakubik, D., Jarosz-Popek, J., Wicik, Z., Eyileten, C., De Rosa, S., Indolfi, C.,

Siller-Matula, J. M., Czajka, P., & Postula, M. (2019). Significance of circulating

microRNAs in diabetes mellitus type 2 and platelet reactivity: bioinformatic analysis and review. In *Cardiovascular Diabetology* (Vol. 18, Issue 1).

<https://doi.org/10.1186/s12933-019-0918-x>

Price, N. L., Ramírez, C. M., & Fernández-Hernando, C. (2014). Relevance of microRNA in metabolic diseases. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 51(6), 305–320. <https://doi.org/10.3109/10408363.2014.937522>

Roos, J., Enlund, E., Funcke, J.-B., Tews, D., Holzmann, K., Debatin, K.-M., Wabitsch, M., & Fischer-Posovszky, P. (2016). miR-146a-mediated suppression of the inflammatory response in human adipocytes. *Scientific Reports*, 6, 38339. <https://doi.org/10.1038/srep38339>

Russo, A., Bartolini, D., Mensà, E., Torquato, P., Albertini, M. C., Olivieri, F., Testa, R., Rossi, S., Piroddi, M., Cruciani, G., De Feo, P., & Galli, F. (2018). Physical Activity Modulates the Overexpression of the Inflammatory miR-146a-5p in Obese Patients. In *IUBMB Life* (Vol. 70, Issue 10, pp. 1012–1022). <https://doi.org/10.1002/iub.1926>

Sanada, T., Sano, T., Sotomaru, Y., Alshargabi, R., Yamawaki, Y., Yamashita, A., Matsunaga, H., Iwashita, M., Shinjo, T., Kanematsu, T., Asano, T., & Nishimura, F. (2020). Anti-inflammatory effects of miRNA-146a induced in adipose and periodontal tissues. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 22, 100757. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100757>

Sharma, S., & Eghbali, M. (2014). Influence of sex differences on microRNA gene regulation in disease. *Biology of Sex Differences*, 5(1), 3. <https://doi.org/10.1186/2042-6410-5-3>

Siasos, G., Bletsas, E., Stampoulouglou, P. K., Oikonomou, E., Tsigkou, V., Paschou, S. A., Vlasos, K., Marinos, G., Vavuranakis, M., Stefanadis, C., & Tousoulis, D. (2020).

MicroRNAs in cardiovascular disease. *Hellenic Journal of Cardiology: HJC = Hellenike Kardiologike Epitheorese*, 61(3), 165–173.

<https://doi.org/10.1016/j.hjc.2020.03.003>

Soltero, E. G., Solovey, A. N., Hebbel, R. P., Palzer, E. F., Ryder, J. R., Shaibi, G. Q., Olson, M., Fox, C. K., Rudser, K. D., Dengel, D. R., Evanoff, N. G., & Kelly, A. S. (2021). Relationship of Circulating Endothelial Cells With Obesity and Cardiometabolic Risk Factors in Children and Adolescents. *Journal of the American Heart Association*, 10(1), e018092. <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.018092>

Stern, J. H., Rutkowski, J. M., & Scherer, P. E. (2016). Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. *Cell Metabolism*, 23(5), 770–784.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.04.011>

Sun, W., Julie Li, Y.-S., Huang, H.-D., Shyy, J. Y.-J., & Chien, S. (2010). microRNA: a master regulator of cellular processes for bioengineering systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 12, 1–27. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-070909-105314>

Thomou, T., Mori, M. A., Dreyfuss, J. M., Konishi, M., Sakaguchi, M., Wolfrum, C., Rao, T. N., Winnay, J. N., Garcia-Martin, R., Grinspoon, S. K., Gorden, P., & Kahn, C. R. (2017). Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature*, 542(7642), 450–455. <https://doi.org/10.1038/nature21365>

Twig, G., Yaniv, G., Levine, H., Leiba, A., Goldberger, N., Derazne, E., Ben-Ami Shor, D., Tzur, D., Afek, A., Shamiss, A., Haklai, Z., & Kark, J. D. (2016). Body-Mass Index in 2.3 Million Adolescents and Cardiovascular Death in Adulthood. *The New England Journal of Medicine*, 374(25), 2430–2440. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1503840>

- Vriens, A., Provost, E. B., Saenen, N. D., De Boever, P., Vrijens, K., De Wever, O., Plusquin, M., & Nawrot, T. S. (2018). Children's screen time alters the expression of saliva extracellular miR-222 and miR-146a. *Scientific Reports*, 8(1), 8209. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26351-2>
- Vrijens, K., Bollati, V., & Nawrot, T. S. (2015). MicroRNAs as potential signatures of environmental exposure or effect: a systematic review. *Environmental Health Perspectives*, 123(5), 399–411. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408459>
- West, C., & McDermott, M. F. (2017). Effects of microRNA-146a on the proliferation and apoptosis of human osteochondrocytes by targeting TRAF6 through the NF- κ B signalling pathway [Review of *Effects of microRNA-146a on the proliferation and apoptosis of human osteochondrocytes by targeting TRAF6 through the NF- κ B signalling pathway*]. *Bioscience Reports*, 37(4). <https://doi.org/10.1042/BSR20170180>
- [WHO]. (2013). Why does childhood overweight and obesity matter. In 2013/11/15). <http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhoodconsequences/en>.
- WHO. (2018). *Obesity and overweight*. WHO. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Xie, Y., Chu, A., Feng, Y., Chen, L., Shao, Y., Luo, Q., Deng, X., Wu, M., Shi, X., & Chen, Y. (2018). MicroRNA-146a: A Comprehensive Indicator of Inflammation and Oxidative Stress Status Induced in the Brain of Chronic T2DM Rats. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 478. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00478>